Lane Medical Library

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München.
Vorstand: Professor Dr. Broemser.)

Über die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Walter Schlickenrieder
aus Schwabhausen.

München
Buchdruckerei Hohenhaus, Landwehrstraße 29 (Ecke Schillerstraße)
1936

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München.

In Dankbarkeit meinen lieben Eltern
gewidmet!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153312_0145

Über die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff.

Der Erholungsvorgang im Muskel ist, soweit die Milchsäure in Frage kommt, eine Neubildung von Kohlehydraten aus Milchsäure. Hahn, Belmonte und Niemer haben gezeigt, daß diese Resynthese von Kohlehydraten aus Milchsäure nur im intakten und unverletzten Muskel stattfinden kann (1). Die Neubildung von Kohlehydraten vollzieht sich nur bei Gegenwart von Sauerstoff und unter starker Steigerung der Atmung des Muskels.

Im zerkleinerten Muskel spielen sich bei Gegenwart von Sauerstoff ganz andersartige Vorgänge ab. Hier übt der Sauerstoff eine hemmende Wirkung auf die Bildung der Milchsäure aus Kohlehydraten aus. Bei den Versuchen mit Muskelbrei zeigte sich bei Gegenwart von Sauerstoff ein Konstantbleiben der Milchsäurewerte; das heißt, es konnte keine Verminderung der Milchsäure bei gleichzeitiger Vermehrung von Kohlehydraten beobachtet werden. Es handelt sich also hier nicht um einen wirklichen Erholungsvorgang.

Neuere Versuche.

Bei Digestion von Muskelbrei im Vakuum findet stets eine starke Milchsäurebildung aus Kohlehydraten (Glykolyse) statt, die bei Gegenwart von Sauerstoff nicht beobachtet wird. In den meisten Fällen wurde die Milchsäurebildung ganz aufgehoben gefunden (2).

Die Zusammensetzung der Versuche war folgende:

5 g Muskel
25 ccm Phosphatpuffer (pH = 7; m/25).

Tab. 1. (mg Milchsäure)

Direkt	28,4	21,4	23,6	22,4	23,0	11,5	18,4
Digeriert in Vakuum	49,2	57,5	52,5	40,2	29,0	36,8	51,7
Digeriert mit O_2	24,2	18,0	27,8	21,2	23,6	10,3	26,9

In allen diesen Versuchen nahm die Milchsäue im Vakuum stets sehr stark zu. Bei Gegenwart von Sauerstoff blieb in drei Fällen die Milchsäure konstant, in zwei Fällen erfolgte eine geringe Vermehrung und in zwei weiteren eine leichte Abnahme der Milchsäure.

Es wurden nunmehr Muskelbrei mit der doppelten Gewichtsmenge Phosphatpuffer (pH = 7) $^3/_4$ Stunden geschüttelt, die Waschflüssigkeit („Waschsaft") vom Muskelrückstand („Muskel") abfiltriert und abgepreßt und hierauf die Milchsäurewerte in Sauerstoff, Vakuum und in den direkten Versuchen vom Waschsaft, Muskel und Waschsaft und Muskel) zusammen miteinander verglichen.

Zusammensetzung der Ansätze:

1. Versuche mit Muskel.
   5 g Muskel
   25 ccm Phosphatpuffer
2. Versuche mit Waschsaft.
   25 ccm Waschsaft

3. Versuche mit Muskel und Waschsaft.

5 g Muskel
25 ccm Waschsaft

Es wurde 3 Stunden bei 36—37° C digeriert.

Tabelle 2.

Muskel			Waschsaft			Muskel und Waschsaft		
Direkt	Vakuum	O_2	Direkt	Vakuum	O_2	Direkt	Vakuum	O_2
11,0	15,0	17,6	19,1	30,0	30,0	31,0	50,0	37,9
10,0	25,5	25,5	21,0	43,4	42,2	25,9	85,0	46,0
8,4	14,4	13,2	26,5	47,6	44,5	33,6	61,2	31,2
8,6	25,7	25,4	26,8	55,4	55,4	33,3	84,2	43,7
7,9	19,2	19,2	26,4	56,2	55,2	33,6	76,7	39,6
5,2	18,7	18,5	20,8	50,2	48,0	31,2	73,2	33,6
—	—	—	—	—	—	28,8	85,0	35,6

Aus diesen Versuchen ersieht man, daß im Muskel wie im Waschsaft allein keine Hemmung der Milchsäure durch Sauerstoff stattfindet. Nur in den Versuchen mit Muskel und Waschsaft zusammen beobachtet man eine starke Hemmung bis Aufhebung der Milchsäurebildung. Daraus ist zu entnehmen, daß im Phosphatwaschsaft ein Stoff vorhanden ist, der für die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff notwendig ist und der beim Auswaschen mit Phosphatpuffer aus dem Muskel entfernt wird. Da im Waschsaft allein eine Hemmung der Milchsäurebildung nicht vorkommt, ergibt sich, daß zu diesem Phänomen auch der Muskel selbst noch notwendig ist.

In einem weiteren Versuch (Tabelle 3) wurde dieser Phosphatwaschsaft 3 Minuten gekocht, das ausfallende Eiweiß

Tab. 3.

	Digeriert		
	Direkt	Vakuum	O_2
Ungekocht	29,2	70,5	34,5
Gekocht	28,8	50,6	46,7
Ungekocht	28,3	65,8	34,0
Gekocht	34,0	34,0	92,0

abfiltriert und das Filtrat zum Muskelrückstand zugesetzt und die Milchsäurewerte mit den Versuchen mit ungekochtem Waschsaft verglichen. Es zeigt sich, daß die hemmende Wirkung des Sauerstoffes auf die Milchsäurebildung in dem Filtrat des gekochten Waschsaftes nicht mehr vorhanden ist.

Nunmehr wurde versucht, den für die Hemmung der Milchsäurebildung in Sauerstoff notwendigen Stoff zu isolieren. Zunächst wurde die im Waschsaft vorhandene Eiweißmenge zum größten Teil durch Fällung mit Aceton entfernt.

Dies gelang folgendermaßen: Durch eine Kältemischung wurde der Phosphatwaschsaft auf 0^0C abgekühlt. Dann wurde langsam Aceton, das ebenfalls auf etwa 0^0 abgekühlt wurde, zugegeben und dabei darauf geachtet, daß die Temperatur nie über $2-3^0$ stieg, da sonst die Acetonfällung zu unwirksamen Säften führt. Nach Stehen über Nacht im Eisschrank wird der hauptsächlich aus Eiweiß bestehende Niederschlag mittels Faltenfilter abfiltriert. Das Filtrat wird dann im Vakuum bei $35-38^0$C eingedampft, bis das Aceton vertrieben ist und die Flüssigkeit etwa $^2/_3$ des Volumens des ursprünglichen Waschsaftes hat. Diese Flüssigkeit wurde „Lösung A“ bezeichnet. Mit Lösung A wurden Versuche von der gleichen Zusammensetzung wie die der Versuche mit Waschsaft angestellt.

Tabelle 4.

Muskel			Lösung A			Muskel u. Lösung			H-Zusatz von Hexosediphosphorsäure
	Digeriert			Digeriert			Digeriert		
Direkt	in Vakuum	mit O_2	Direkt	in Vakuum	mit O_2	Direkt	in Vakuum	mit O_2	
4,8	17,5	14,8	32,0	34,6	33,0	38,5	63,8	37,4	—
7,2	44,3	40,5	52,5	56,5	57,0	62,3	96,5	73,0	—
8,1	24,8	21,7	28,8	29,0	29,0	36,4	71,1	39,4	H
7,4	30,9	27,0	44,6	43,8	42,5	46,7	78.6	46,7	H
6,6	29,9	28,8	20,2	23,4	22,8	27,6	59,5	36,2	H

Da durch die Acetonfällung ein Teil der im Waschsaft vorhandenen Milchsäurequellen entfernt wird, wurde zu den mit H (Tab. 4) bezeichneten Versuchen 100 mg hexosediphosphorsaures Natrium als Milchsäurequelle zugesetzt.

Man ersieht aus Tab. 4, daß die Lösung A die gleiche Wirkung hat wie der Waschsaft, das heißt mit Muskel zusammen die Milchsäurebildung in Gegenwart von Sauerstoff zu hemmen.

Im Gegensatz zum Phosphatwaschsaft verliert die Lösung A durch Kochen ihre Wirksamkeit nicht. (Siehe Tab. 5).

Tab. 5. (mg Milchsäure).

	Lösung A			Waschsaft		
	Direkt	Vakuum	O_2	Direkt	Vakuum	O_2
Gekocht	31,3	51,5	30,6	—	—	—
Ungekocht	38,7	58,8	39,6	—	—	—
Gekocht	34,9	51,5	35,1	28,8	50,6	46,7
Ungekocht	43,2	58,0	35,4	29,2	70,5	34,5

Dies ist wohl so zu erklären, daß der Stoff, dessen Gegenwart für die Hemmung der Milchsäurebildung in Sauerstoff notwendig ist, an sich kochbeständig, somit kein Ferment ist. Beim Kochen des Phosphatwaschsaftes koaguliert das Eiweiß. An das Koagulum wird der Stoff adsorbiert und unwirksam gemacht.

In weiteren Versuchen gelang die völlige Enteiweißung des Waschsaftes. Sie wurde ebenfalls mit Aceton vorgenommen.

Dabei ging man ebenso vor wie bei der vorhin beschriebenen Eiweißfällung mit Aceton, nur wurde jetzt etwas mehr Aceton zum Waschsaft zugegeben. Auf 4 Volumteile Waschsaft wurden nun 5 Volumteile Aceton gegeben, womit die völlige Fällung alles im Waschsaft vorhandenen Eiweißes gelang.

Von dem Filtrat dieser Eiweißfällung wurde ebenso wie bei der Herstellung der Lösung A alles Aceton vertrieben und die Lösung noch stark im Vakuum bei 35—38° C eingeengt. Um eine gute Wirksamkeit dieser so gewonnenen Lösung B zu erzielen, empfiehlt es sich, diese auf etwa die Hälfte des ursprünglichen Waschsaftvolumens einzuengen.

Mit Lösung B wurden nun Versuche auf ihre Fähigkeit, die Milchsäurebildung in Sauerstoff zu hemmen gemacht. Bei drei solchen Versuchen wurden Kontrollversuche nebenher angesetzt, um zu ersehen in wieweit die zugesetzten Milchsäurequellen oder der Muskel allein schon jenen Stoff enthielten, der für die Milchsäurehemmung nötig ist.

Als Milchsäurequellen wurden verwendet:

1. Drei Minuten lang gekochter Phosphatwaschsaft. (In den folgenden Tabellen mit P bezeichnet).
2. Drei Minuten lang gekochter Wasserwaschsaft. (Mit W bezeichnet).

3. Kochsaft (Mit K bezeichnet).
   Zu seiner Herstellung wurde Phosphatpuffer (pH = 7) gekocht; dann wurde die halbe Gewichtsmenge eines frischen Muskelbreies in die kochende Pufferlösung gebracht und noch drei Minuten gekocht. Die Fleischteile und das ausfallende Eiweiß wurden abfiltriert und dann als Milchsäurequelle unter dem Namen „Kochsaft" zugesetzt.
4. Hexosediphosphorsaures Natrium pro Ansatz 100 mg. (Mit H bezeichnet).

Die Ansätze zu den Versuchen mit Lösung B waren folgende.

1. Kontrollversuch.
   5 g Muskel
   10 ccm Puffer (pH = 7) mit Wasser im Verhältnis 2 : 1.
   20 ccm Milchsäurequelle.
2. Hauptversuch mit Lösung B.
   5 g Muskel
   25 ccm Lösung B
   20 ccm Milchsäurequelle.

Tab. 6 (mg Milchsäure)

Kontrolle			Lösung B			Milchsäurequelle
Direkt	Vakuum	O_2	Direkt	Vakuum	O_2	
—	—	—	37,5	46,6	33,4	—
13,5	27,2	26,2	31,2	49,7	40,5	P
—	—	—	35,2	45,0	32,1	P
11,7	21,5	20,8	44,1	64,9	53,0	W
20,6	42,7	47,1	60,5	72,5	59,2	K
—	—	—	65,2	105,0	71,5	K
—	—	—	52,3	84,5	59,0	K

Diese Versuche zeigen das Vorhandensein jenes gesuchten Stoffes in Lösung B. Beim letzten Versuch (Tab. 6) wurde eine Lösung B verwendet, die 4 Tage im Eisschrank gestanden hatte, was die Haltbarkeit dieser Lösung beweist.

Isolierversuche mit Lösung B.

Gibt man zur Lösung B das Fünffache an Volumen Aceton, so kommt es zum Auftreten eines grünlichen und hypogroskopischen Niederschlages.

Man geht am besten in der Weise vor, daß man hiezu nicht die Lösung B, sondern das Filtrat des mit Aceton im Verhältnis 5 : 4 enteiweißten Phosphatwaschsaftes verwendet, das aus annähernd gleichen Mengen eiweißfreien Waschsaftes und aus Aceton besteht. Zu dieser Lösung gibt man das dreifache Volumen Aceton hinzu. Es tritt sogleich ein flockiger Niederschlag auf, der sich nach etwa 24 Stunden gut abgesetzt hat. Dann wird die überstehende meist klare, jedoch manchmal auch leicht getrübte Flüssigkeit abgegossen und der Rest mit dem Niederschlag dann auf einer Nutsche abgesaugt. Der Niederschlag wird dann in einem Exsiccator getrocknet. Er wurde als „Rohfällung" bezeichnet.

Aus 1 kg Muskelbrei ließen sich auf diese Weise ungefähr 4 kg dieser Rohfällung gewinnen.

Untersuchung der Fällung.

Bei qualitativer Untersuchung der Fällung wurden Stickstoff und Phosphate gefunden.

Die Mikroanalyse auf Stickstoff ergab einen Stickstoffgehalt von 29,2%.

Stickstoffberechnung für Kreatin:

$$C_4H_9O_2N_3 \quad = 32{,}05\,\%\ \text{N.}$$
$$C_4H_9O_2N_3 + H_2O \quad = 28{,}1\,\%\ \text{N.}$$

Die in Wasser aufgelösten Proben der Fällung geben nach Zusatz von Salzsäure und nach Erhitzen im Wasserbad die Jaffésche Reaktion auf Kreatinin.

Die Phosphatbestimmungen ergaben folgende Werte:

1. Rohfällung: Anorganisches Phosphat: 7,8 %
   Gesamte Phosphatmenge: 7,75 %
2. Gereinigte Fällung: (2 mal mit Wasser und Aceton umgefällt, wobei $^3/_4$ der Substanz verloren gehen).
   Anorganisches Phosphat: 5,0 %
   Gesamtphosphat: 4,2 %

Daraus ist zu ersehen, daß die Fällung aus einem Gemisch von Kreatin und anorganischen Phosphaten besteht. Sie enthält also kein an organische Bestandteile gebundenes Phosphat.

Versuche mit diesen Substanzen.

Es galt nun die Fällung und das acetonfrei gemachte und eingeengte Filtrat dieser Fällung auf ihre Wirksamkeit zu prüfen. Für den Fall, daß die Fällung die Fähigkeit hat, bei Gegenwart von Sauerstoff hemmend auf die Milchsäurebildung einzuwirken, war anzunehmen, daß auch das im Handel befindliche Kreatin diese Wirkung haben sollte, da die Fällung in der Hauptsache aus Kreatin besteht.

Versuche mit Rohfällung und Filtrat.

Ansätze: 1. Kontrolle.
5 g Muskel
15 ccm Milchsäurequelle
15 ccm Puffer und Wasser im Verhältnis 2 : 1

2. Rohfällung
5 g Muskel
15 ccm Milchsäurequelle
15 ccm einer 2 %igen Lösung der Rohfällung

3. Filtrat.

5 g Muskel
15 ccm Milchsäurequelle
15 ccm eingeengtes Filtrat.

Tab. 7 zeigt, daß der milchsäurehemmende Faktor in der Rohfällung vorhanden ist und diese ein milchsäurefreies Präparat darstellt.

Tab. 7.

Kontrolle			Rohfällung			Filtrat			Milchsäure quelle
Direkt	Vakuum	O_2	Direkt	Vakuum	O_2	Direkt	Vakuum	O_2	
—	—	—	11,6	34,6	14,3	21,8	30,8	27,4	—
13,7	36,4	29,3	—	—	—	35,9	45,1	40,4	W
16,9	23,4	21,8	16,6	29,3	21,2	—	—	—	W
16,0	29,1	27,9	15,2	33,4	22,2	—	—	=	W
21,6	35,0	33,3	21,6	35,7	29,2	—	—	—	W

Der Versuch mit der gereinigten Fällung (Tab. 8) zeigt eine abgeschwächte Wirkung gegenüber der Rohfällung.

Tab. 8 (mg Milchsäure)

Kontrolle			Gereinigte F.			Gohfällung			Milchsäure-quelle
Direkt	Vakuum	O_2	Direkt	Vakuum	O_2	Direkt	Vakuum	O_2	
21,6	35,0	33,3	20,6	35,1	30,6	21,6	35,7	29,2	W

Im Versuch wurden pro Ansatz 15 ccm einer 0,5 %igen Lösung der gereinigten Fällung verwendet.

Versuche mit Kreatin.

Tabelle 9.

Kontrolle			Kreatin			Milchsäurequelle
Direkt	Vakuum	O_2	Direkt	Vakuum	O_2	
10,0	19,9	15,2	10,0	20,0	15,1	P
16,5	42,9	37,2	18,3	48,6	41,5	H

Im ersten Versuch (Tab. 9) wurde eine gesättigte, im zweiten eine 2%ige Lösung von Kreatin verwendet. Diese Versuche zeigen, daß das Kreatin nicht jener gesuchte Stoff ist, der die Milchsäurebildung in Gegenwart von Sauerstoff hemmt.

Daher muß angenommen werden, daß dieser Stoff eine Beimengung der Rohfällung ist, die durch das Umfällen zu einem großen Teil zugrunde geht.

Zusammenfassung.

1. Es wurde gezeigt, daß die Hemmung der Milchsäurebildung durch Sauerstoff im Muskel bedingt ist durch einen Stoff, der sich durch Auswaschen mit Phophatpuffer aus der Muskulatur entfernen läßt.

2. Es gelang diesen in seiner Konstitution bisher noch unbekannten Stoff vollständig von der Eiweißfraktion durch Acetonfällung zu trennen.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Hahn für die freundliche Überlassung der Arbeit und für seine Ratschläge bestens zu danken. Außerdem möchte ich auch Herrn Dr. Niemer für seine freundliche Unterstützung und Hilfe meinen Dank aussprechen.

Literatur.

1. Hahn, Belmonte und Niemer (Zeitschrift f. Biologie, Band 91, 6 1931).
2. Hahn, Niemer (Zeitschrift f. Biologie Bd. 97, 1936).

Lebenslauf.

Als Sohn des prakt. Arztes Dr. Hans Schlickenrieder wurde ich am 9. August 1910 in Schwabenhausen geboren. 1912 siedelte ich mit meinen Eltern nach Altomünster um, wo ich von 1916—1920 die Volksschule besuchte. Dann war ich bis 1926 am Progymnasium in Schäftlarn. Den Rest meiner Mittelschuljahre verbrachte ich am Maximilians-Gymnasium in München, wo ich im Frühjahr 1929 die Reifeprüfung ablegte. Dann studierte ich in München Medizin. Nach Ablegung des Staatsexamens im Herbst 1934 war ich Medizinalpraktikant an der orthopädischen Poliklinik und I. Univ.-Klinik in München. Am 1. Januar 1936 erhielt ich meine Approbation als Arzt. Seither arbeitete ich an obiger Arbeit am Physiologischen Institut unter Prof. Hahn.